CORSO INTEGRATO DI GENETICA

a.a.2011-2012

Prof. Pier Franco Pignatti

30.11.2011

Lezioni N. 45-46

Mutazioni e malattie genetiche

Neri-Genuardi cap. 2,3,8,10,22,25

Puntiformi, ins/del, CNVs, conversione genica

Mutazione: una definizione

Mutazione: una alterazione della sequenza del DNA rispetto al normale

Polimorfismo : una variante con frequenza > 1% nella popolazione

NOTA: in medicina è invalso l'uso di chiamare "mutazione" una variazione del DNA ritenuta causa di patologia, e "polimorfismo" una variazione del DNA non ritenuta causa di patologia

Mutazione: caratteristiche

Insorgenza: casuale, preadattativa

Sede: somatica, germinale

Livello: genica, cromosomica, genomica

Meccanismo: sostituzione, inserzione, ripetizione, inversione, espansione, delezione, riarrangiamento

Cause: endogene, esogene

Effetti evolutivi: neutra, svantaggiosa, vantaggiosa

Stima diretta della frequenza di mutazione

Table 6–2. **Estimates of Mutation Rates for Selected Human Genes**

Gene	Inheritance	Mutation Rate*	New Mutations per 10^6 Gametes
Achondroplasia	AD	$0.6–4 \times 10^{-5}$	6–40
Aniridia	AD	$2.5–5 \times 10^{-6}$	2.5–5
Duchenne muscular dystrophy	XR	$0.4–1 \times 10^{-4}$	43–105
Hemophilia A	XR	$3–6 \times 10^{-5}$	32–57
Hemophilia B	XR	$2–3 \times 10^{-6}$	2–3
Neurofibromatosis, type 1	AD	$0.4–1 \times 10^{-4}$	44–100
Polycystic kidney disease	AD	$0.6–1.2 \times 10^{-4}$	60–120
Retinoblastoma	AD	$5–12 \times 10^{-6}$	5–12

Based on data in Vogel F, Motulsky AG (1986) Human genetics (2nd ed). Springer-Verlag, Berlin.
AD = autosomal dominant; XR = X-linked recessive.
* Expressed as mutations/locus/generation.

La stima diretta è probabilmente una sottostima a causa di: penetranza incompleta, fenocopie, eterogeneità genetica, non paternità, "polimorfismi", riparazione, letalità…

FREQUENZA DELLE MUTAZIONI

Table 6-1. Types of Mutation and Their Estimated Frequencies

Class of Mutation	Mechanism	Frequency (Approximate)	Examples
Genome mutation	Chromosome missegregation	10^{-2}/cell division	Aneuploidy
Chromosome mutation	Chromosome rearrangement	6×10^{-4}/cell division	Translocations
Gene mutation	Base pair mutation	10^{-10}/base pair/cell division 10^{-5}–10^{-6}/locus/generation *	Point mutations

Based on Vogel F, Motulsky AG (1986) Human genetics (2nd ed). Springer-Verlag, Berlin.

Se un gamete ha 25.000 geni, il 2-25% dei gameti avrà almeno una nuova mutazione genica
(25.000/100.000 = 0.25; 25.000/1.000.000 = 0.025)

Frequenza di mutazione: stime recenti

Il tasso di mutazione per sostituzione di base nella linea germinale è circa 10-8 per coppia di basi per generazione (sequenziamento ad alta densità di 2 trii padre madre figlio). Ogni gamete avrebbe perciò circa 60 nuove mutazioni.

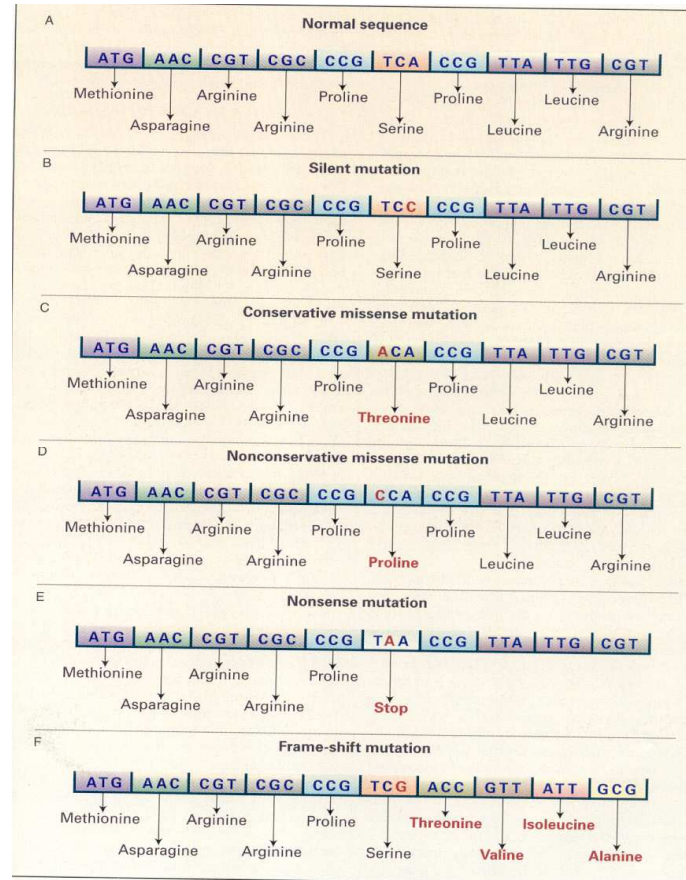
Ogni persona ha circa 250-300 varianti con perdita di funzione in geni annotati, cioè in circa l'1% di tutti i geni, e 50-100 varianti precedentemente implicate in malattie ereditarie (WGS di 179 individui)

The 1000 Genomes Project, Nature 28 ottobre 2010

TIPI DI MUTAZIONE

Strutturali: puntiformi, inserzioni, delezioni, inversioni, duplicazioni, interruzione gene per riarrangiamento cromosomico

Regolative: trascrizionali o post-trascrizionali, nel promotore o in altre sequenze di regolazione, modificazione dello splicing

MUTAZIONI PUNTIFORMI e INS

SINONIMA o SILENTE

SOSTITUZ (conservativa)

SOSTITUZ (non conserv.)

TERMINAZIONE

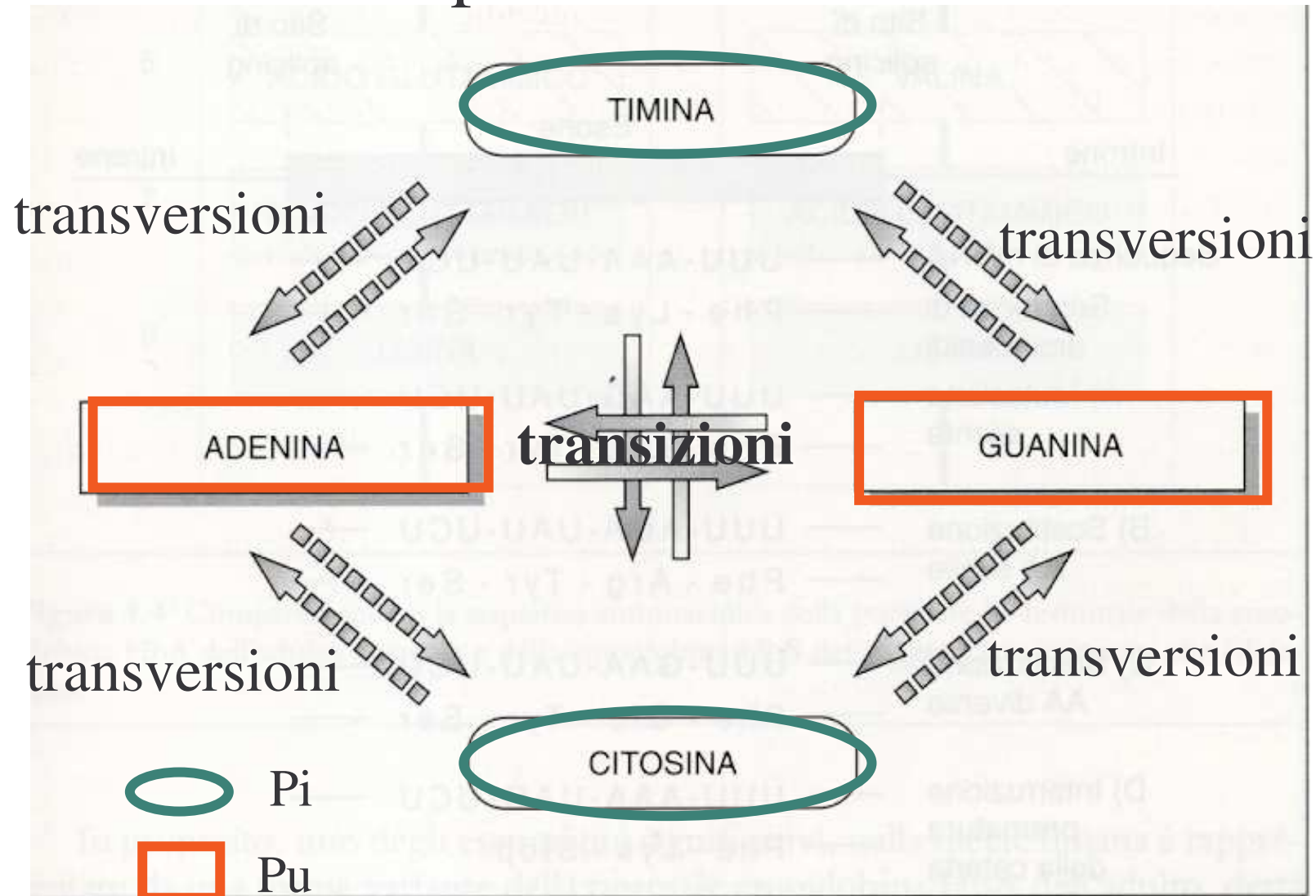
SCIVOLAM. MODULO

Guttmacher e Collins, NEJM 347:1517, 2002

Il CODICE GENETICO

prima lettera	seconda lettera U	C	A	G	terza lettera
U	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR *STOP* *STOP*	CYS CYS *STOP* TRP	U C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLN GLN	ARG ARG ARG ARG	U C A G
A	ILE ILE ILE MET	THR THR THR THR	ASN ASN LYS LYS	SER SER ARG ARG	U C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY	U C A G

Codoni	aa
1	2
2	9
3	1
4	5
6	3
61	**20**
3	X
64	**20**

Mutazioni per sostituzione di base

Mutazioni con perdita di funzione

Per la maggior parte dei prodotti genici la quantità esatta non è essenziale: la maggior parte delle mutazioni con perdita di funzione produce **fenotipi recessivi**, il che significa che una persona che abbia una sola copia funzionale del gene sarà fenotipicamente normale.

In alcuni casi però il 50% del livello normale non è sufficiente per la funzione normale: persone eterozigoti per una mutazione con perdita di funzione mostrano un fenotipo che è perciò ereditato come un **carattere dominante**. Questo si chiama **aploinsufficenza**.

Perdita di funzione

Figure 6.9 – **Whether a loss of function mutation causes a dominant or a recessive condition depends on how sensitive the organism is to loss of that function.** If the threshold for normal function is as shown in (a) a heterozygote with 50% function will be affected, and the condition will be dominant. This situation is called haplo-insufficiency. If the threshold is as in (b) the condition will be recessive.

Read A e D Donnai, New Clinical Genetics 2° ed. Scion 2011

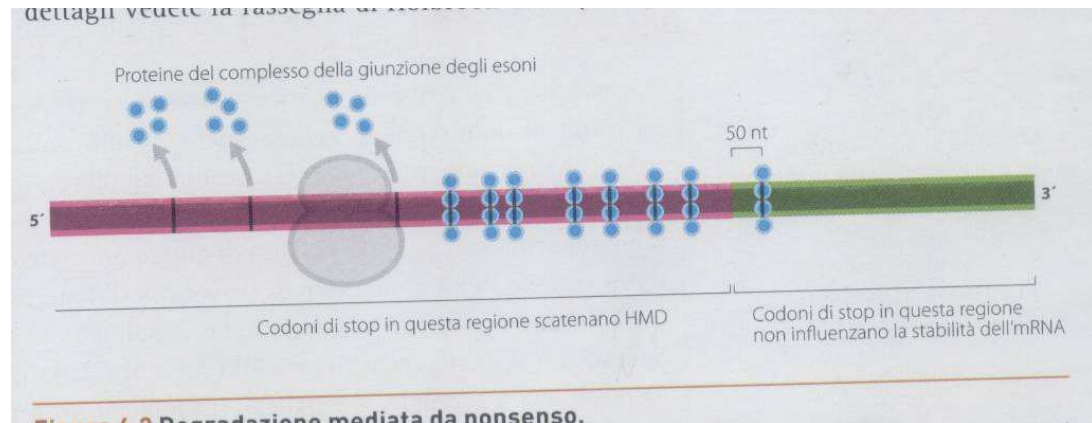
MUTAZIONE di SOSTITUZIONE aa β^{s}-globina e falcemia

Read-Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 153

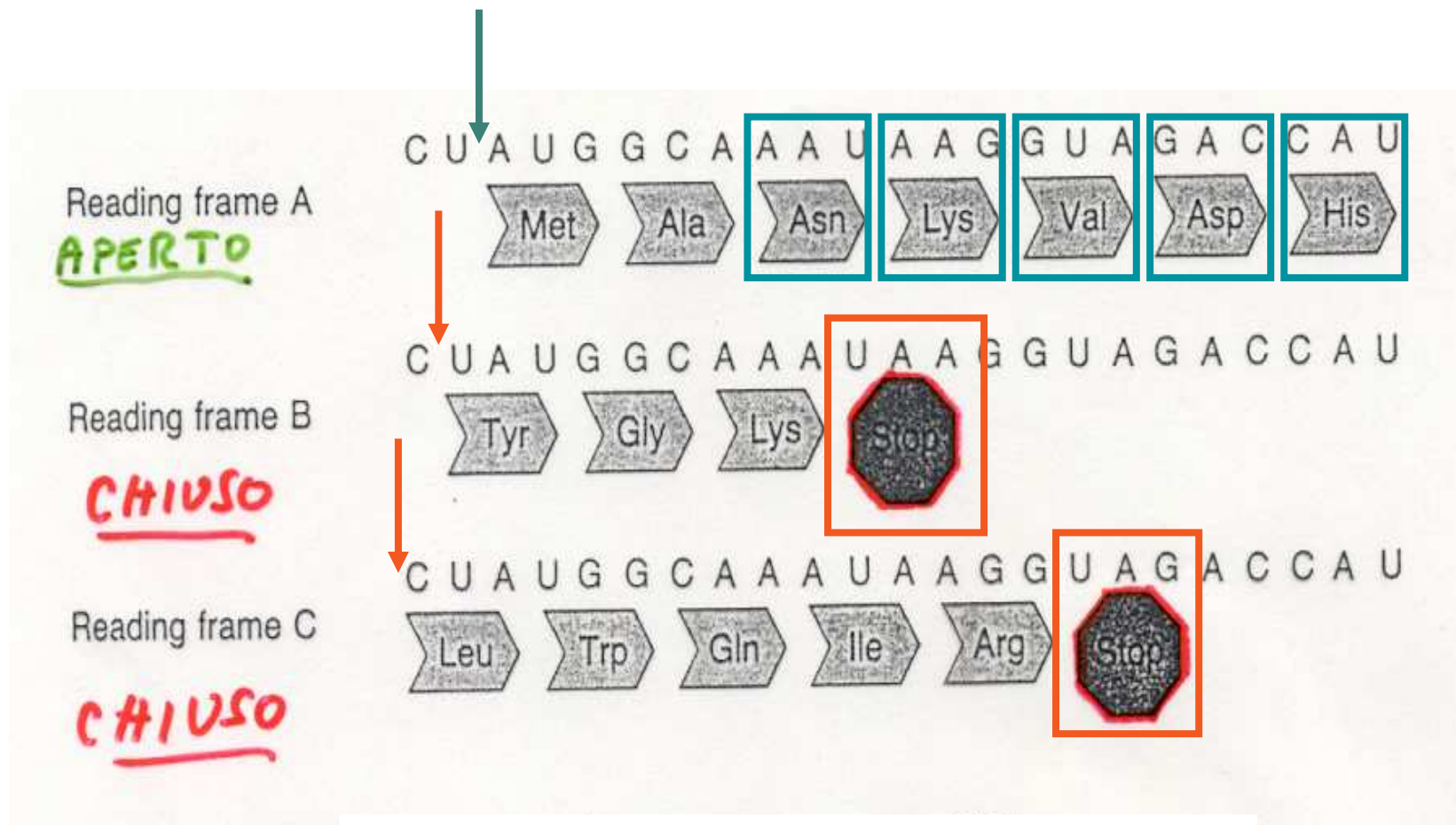
MUTAZIONE di TERMINAZIONE
p.Gln39X e β°talassemia

transizione CAG>TAG

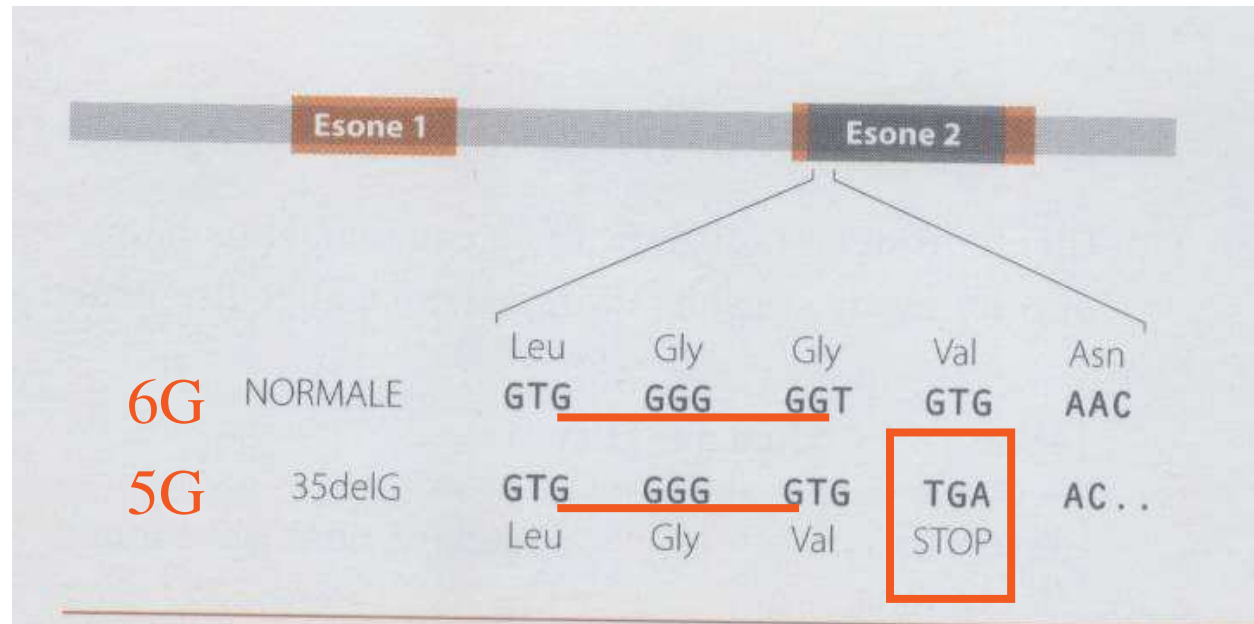
Read-Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 153

Degradazione mediata da nonsenso (NMD: Nonsense Mediated Decay)

Se il codone di Terminazione Prematura (PTC) è in zona rossa, l'Exon Junction Complex (EJC) non si stacca e l'mRNA è degradato.
Es: NMD degrada maggior parte mRNA BRCA1 con PTC

Read-Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 149

CORNICE di LETTURA (reading frame)

Berg e Singer, Dealing with Genes, Blackwell 1992

MUTAZIONE da SCIVOLAMENTO

c.35delG gene connessina 26 (GJB2) e sordità AR

Read-Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 148

Mutazioni con guadagno di funzione

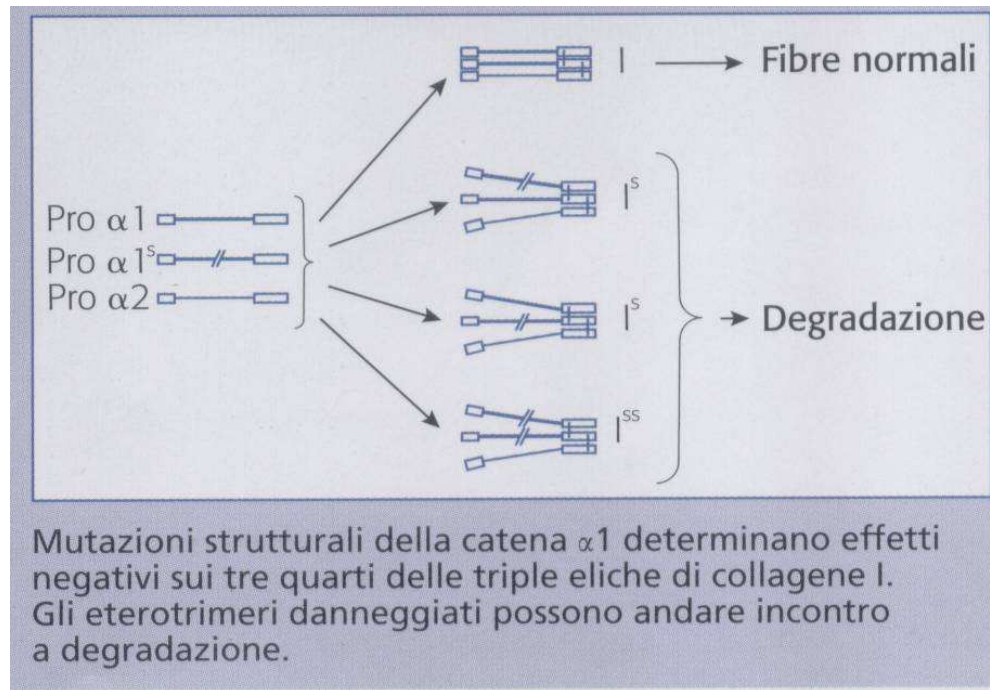
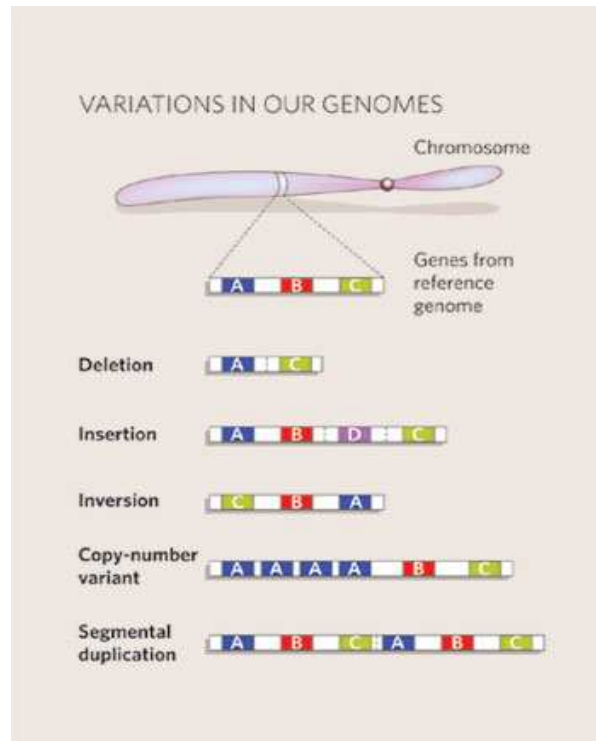
Sono più rare. Determinano **fenotipi dominanti** (es. ACH, HD).

Fenotipi dominanti anche nel caso in cui il prodotto dell'allele mutato interferisca con la funzione del prodotto normale: **effetto dominante negativo** (es. OI).

Strachan e Read 4th ed p.405

Effetto dominante negativo in OI

Mutazioni strutturali della catena α1 determinano effetti negativi sui tre quarti delle triple eliche di collagene I. Gli eterotrimeri danneggiati possono andare incontro a degradazione.

Neri e Genuardi Genetica umana e medica, IIed, Masson 2010

VARIANTI STRUTTURALI

Differenze frequenti fra individui: non solo singoli nucleotidi (SNPs) ma anche variazioni strutturali più grosse (del, ins, inv, CNVs, dup) a volte implicate in malattie

DNA CNVs

Tratti di DNA ripetuti più lunghi di 1 kb che mostrano differenze del numero di copie nella popolazione normale

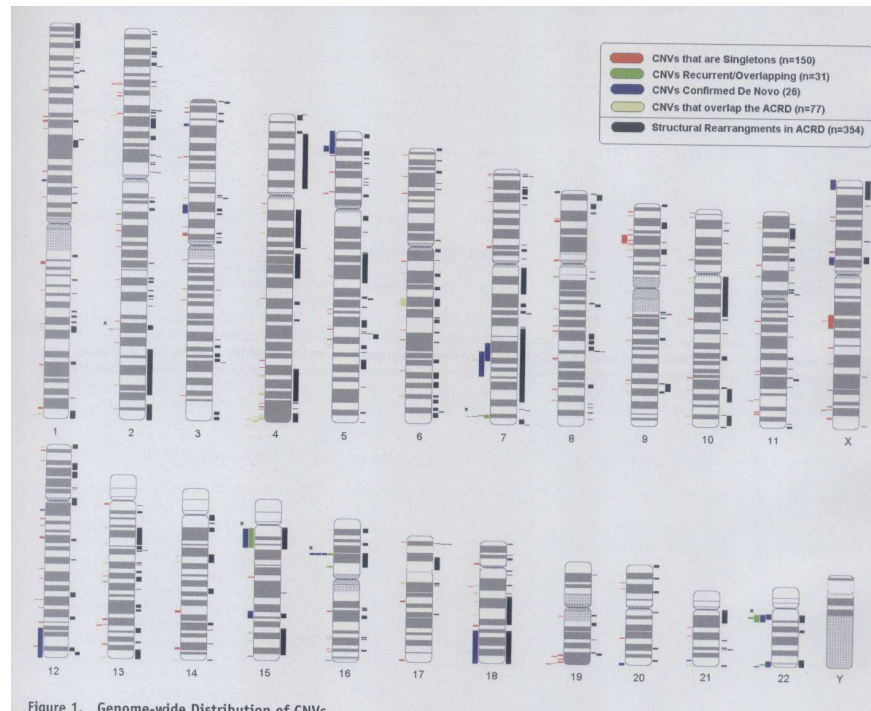
Espressione diversa dei geni con diverso numero di copie

Possibile associazione con malattie

Mappa ad alta risoluzione 20 europei e 20 africani per CNVs: frequenza >5%

Conrad DF et al Nature online Ott. 2009

CNVs in AUTISMO

Figure 1. Genome-wide Distribution of CNVs

Marshall CR et al, AJHG 2008

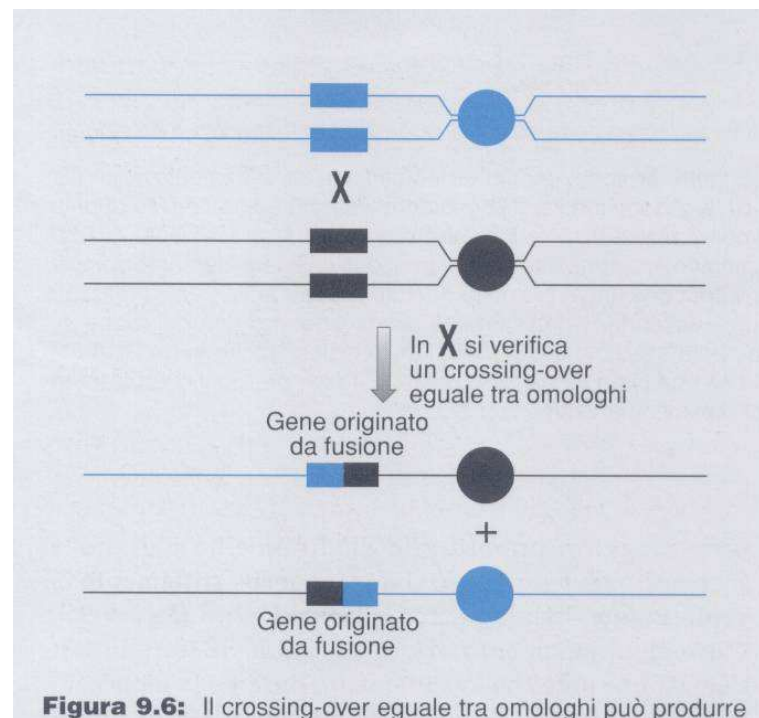
Trovati 277 CNVs dei quali 13 ricorrenti. La ricerca delle CNV fa parte ormai della valutazione diagnostica iniziale di malattie dello spettro autistico ed altre malattie con ritardo mentale e dello sviluppo

Delezioni esoniche e DMD/BMD

Esone	Dimensioni (bp)	Modulo di lettura	Malattia
41	183	0	BMD
42	195	0	BMD
43	173	−1	DMD
44	148	+1	DMD
45	176	−1	DMD
46	148	+1	DMD
47	150	0	BMD
48	186	0	BMD
49	102	0	BMD
50	109	+1	DMD

Read-Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 148

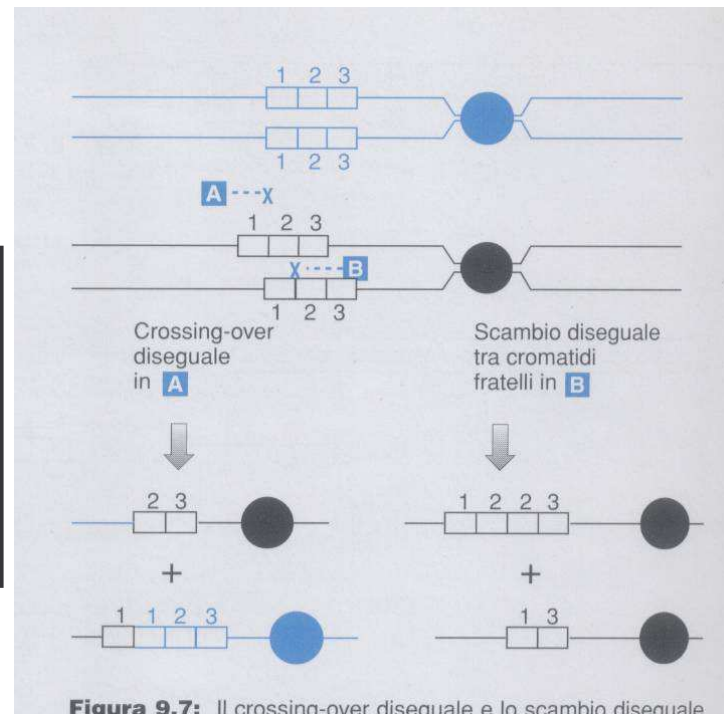
Crossing-over fra sequenze alleliche

Figura 9.6: Il crossing-over eguale tra omologhi può produrre

Sono prodotti geni di fusione

Read e Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 226

Crossing-over fra sequenze non alleliche

A: crossing over diseguale (UEC)

Figura 9.7: Il crossing-over diseguale e lo scambio diseguale

B: scambio diseguale fra cromatidi fratelli (UESCE)

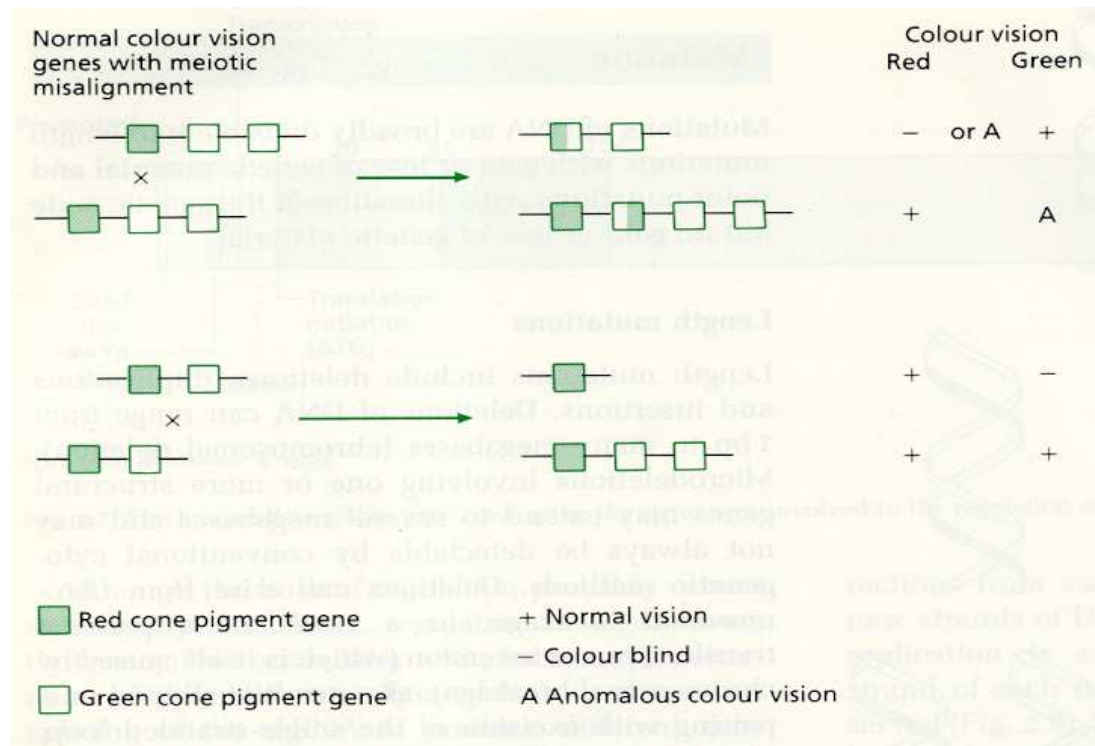
Sono prodotte inserzioni e delezioni

Read e Donnai, Genetica Clinica, Zanichelli 2007, pg 226

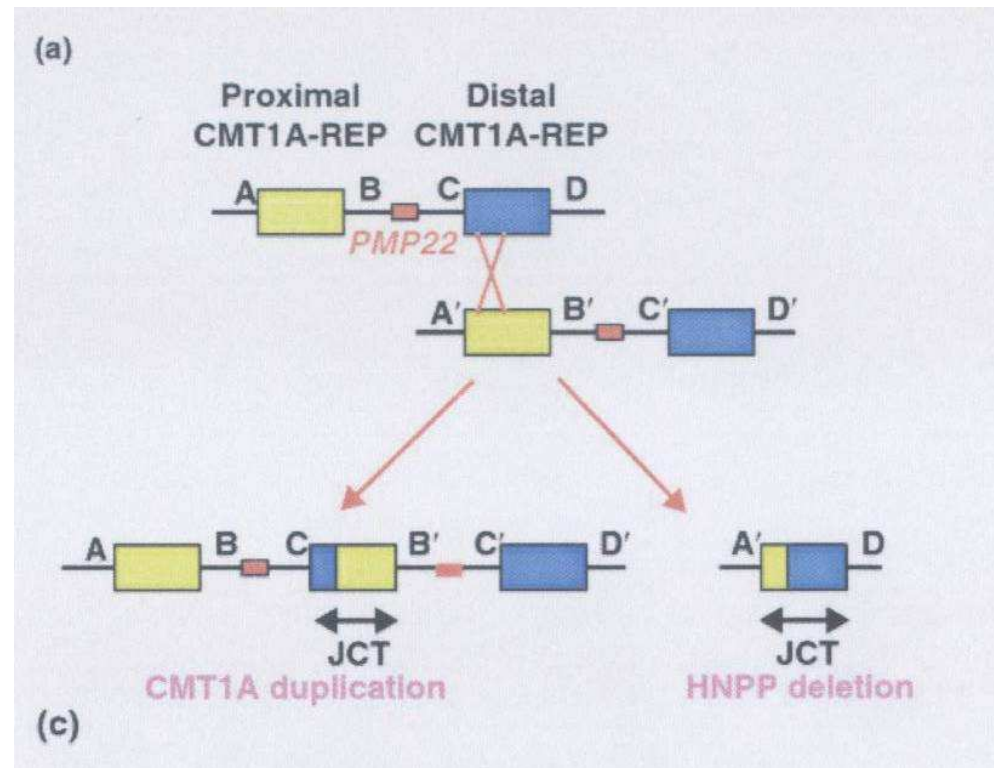
CROSSING-OVER INEGUALE

Emoglobine Lepore

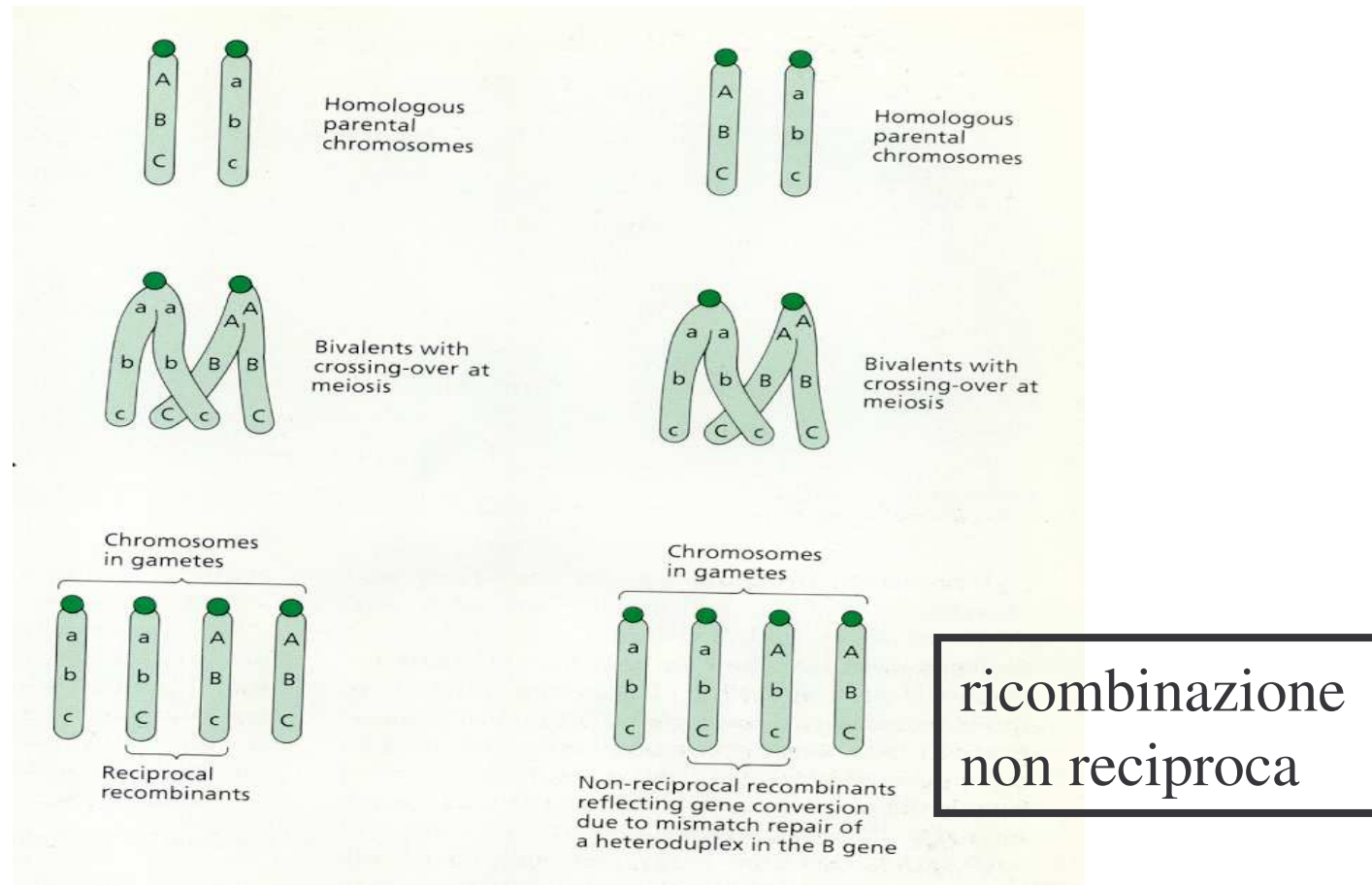
Harris, Genetica Biochimica Umana, Zanichelli 1972

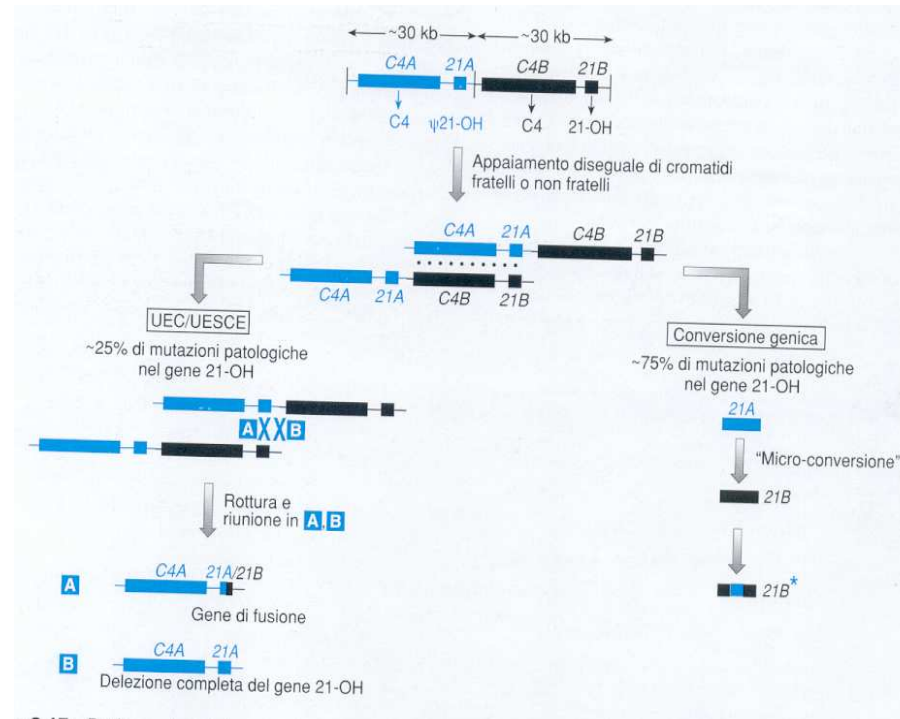
C-O INEGUALE geni visione colori

Xq 28: 1 copia gene pigmento rosso e 1-3 copie verde

Connor e Ferguson-Smith Essential Medical Genetics Blackwell 1993

Dosaggio genico locus PMP22 cr.17p12

CMT1A: Neuropatia demielinizzante Charcot-Marie-Tooth tipo 1A
HNPP: Neuropatia ereditaria con paralisi da pressione

CONVERSIONE GENICA

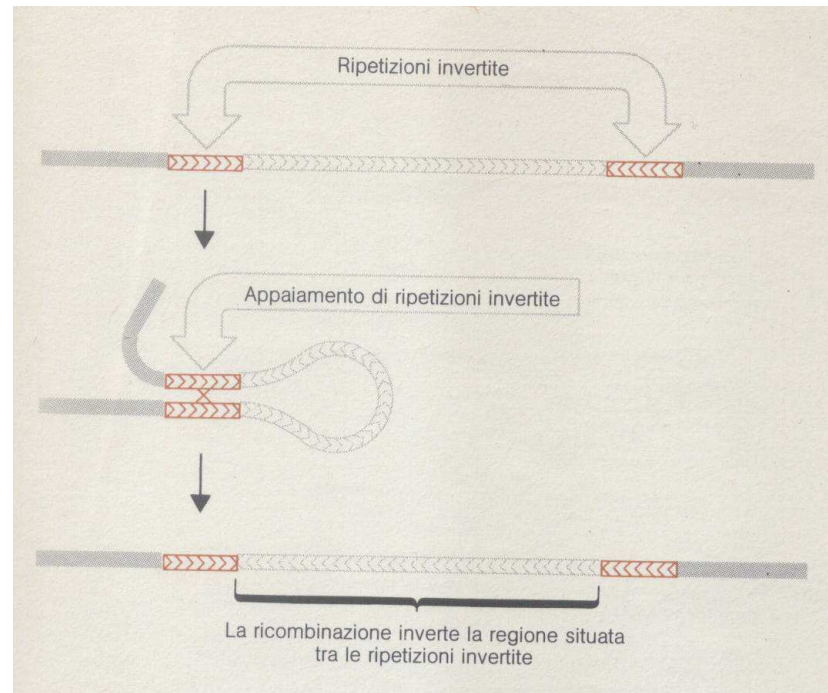
ricombinazione
non reciproca

Connor e Ferguson-Smith, Essential Medical Genetics, Blackwell 1993

Ricombinazione gene steroido 21 idrossilasi

Geni CYP21 e C4 del complemento duplicati nella regione HLA. 21A: pseudogene. 21B: gene espresso 21-OHlasi. Mutazioni 21B: iperplasia surrenale congenita con diminuita produzione di cortisolo. Tre forme: con perdita di sali, semplice virilizzante, o attenuata con inizio tardivo solo nelle femmine

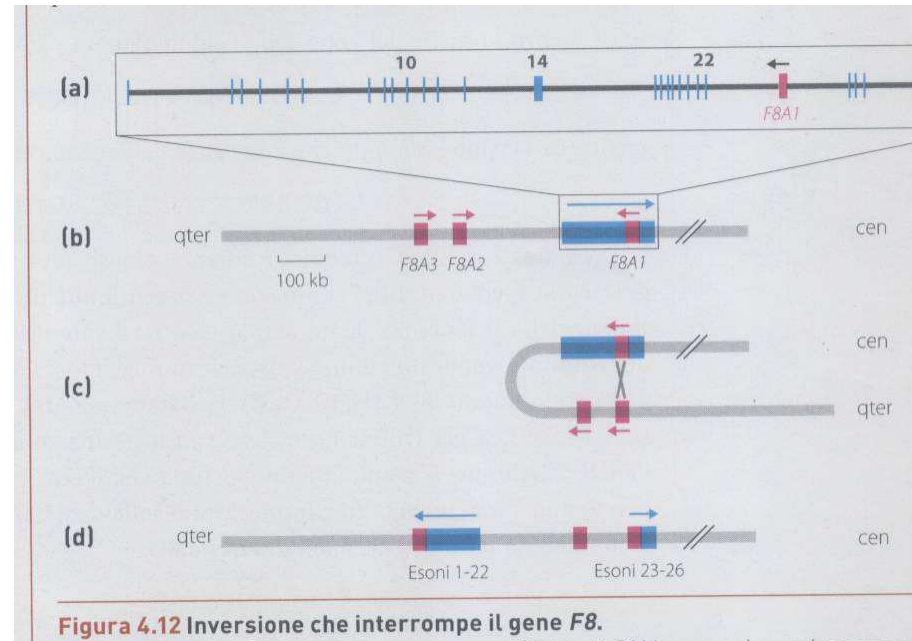
Microconversione: mutazioni CYP21derivano dallo pseudogene

Localizzazione della mutazione	Sequenza del gene 21-OH normale (*CYP21B*)	Sequenza dello pseudogene 21-OH (*CYP21A*)	Sequenza del gene 21-OH mutante
Introne 2	CCCA**C**CTCC	CCCA**G**CTCC	CCCA**G**CTCC
Esone 3 (codoni 110-112)	G**GA** **GAC** **TAC** TC **Gly** **Asp** **Tyr** **Ser**	G(.........)TC	G(.........)TC **Val**
Esone 4 (codone 172)	ATC A**T**C TGT Ile **Ile** Cys	ATC A**A**C TGT	ATC A**A**C TGT Ile **Asn** Cys
Esone 6 (codoni 235-238)	A**T**C G**T**G GAG A**T**G **Ile** **Val** Glu **Met**	A**A**C G**A**G GAG A**A**G	A**A**C G**A**G GAG A**A**G **Asn** **Glu** Glu **Lys**
Esone 7 (codone 281)	CAC **G**TG CAC His **Val** His	CAC **T**TG CAC	CAC **T**TG CAC His **Leu** His
Esone 8 (codone 318)	CAC **C**AG GAG His **Gln** Glu	CTG **T**AG GAG	CTG **T**AG GAG Leu **STOP**
Esone 8 (codone 356)	CTG **C**GG CCC Leu **Arg** Pro	CTG **T**GG CCC	CTG **T**GG CCC Leu **Trp** Pro

Strachan e Read, Genetica Umana Molecolare, UTET 2000

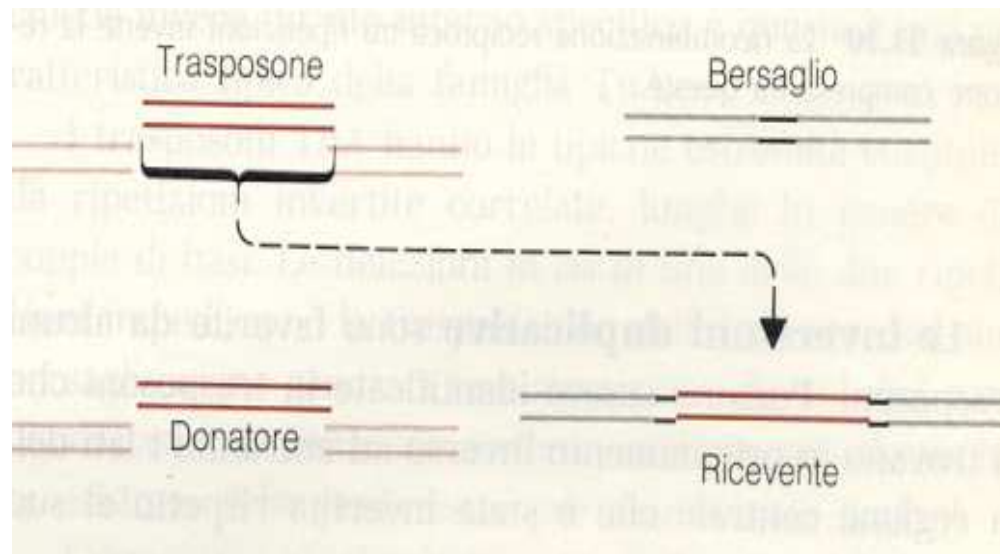
INVERSIONE

Lewin B, Il Gene, Zanichelli 1985

Inversione gene F8 ed emofilia

Figura 4.12 **Inversione che interrompe il gene *F8*.**

Rettangoli rossi: sequenza nell'introne 22 e due copie invertite a monte del gene. Nella meiosi maschile non c'è partner: si può formare un'ansa con due copie appaiate con lo stesso orientamento. La ricombinazione produce una inversione cromosomica di circa 500 kb che interrompe il gene. Il 40% dei casi gravi di emofilia A è provocato da inversione

TRASPOSONI

I trasposoni sono stati scoperti da
Barbara McClintock nel mais negli anni ’40
Premio Nobel nel 1983

Trasposizione replicativa

Es: il retrotrasposone L1 si può inserie nei geni F-VIII o DMD: inattivazione inserzionale

Variazioni in gemelli MZ da retrotrasposizione con inserzione di L1

Martin SL Nature 2009